ReproCardio2 解凍播種 取扱説明書

品番:RCESD008

実験操作の重要ポイント

- 凍結細胞バイアルは −80℃冷凍庫で保管して、消費期限内になるべく早くご使用ください。(※液体窒素には入れないで下さい。生存率が著しく低下します。)
- 細胞の解凍から培地への移行は5分以内、さらに播種までは45分以内に行なってください。操作に時間がかかると、生存率が著しく低下します。
- 初めての場合、細胞の解凍から培地への移行(ステップ 2.1-2.8)については、事前に練習用バイアル(細胞なし)を用いて、練習を行ってください。
- ピペッティングにより細胞がダメージを受けますので、バイアルからピペットで細胞懸濁液を吸うときに、3 秒数えるようにゆっくりと吸うように注意して下さい。
- 細胞の解凍は必ず1バイアルずつ行なってください。

製品内容

①	凍結細胞バイアル(3.4×10^5 cells x 3)
②	練習用バイアル(細胞なし)
③	ReproCardio culture medium 2 (FBS-) (80 mL x 2)
④	ReproCoat (30 mL)
⑤	U 底 96-well plate × 1
⑥	平底 96-well plate × 1

保存条件:①②−80℃、③−20℃、④〜⑥室温

＊ReproCardio culture medium 2 (FBS-)には、FBS と抗生物質は含まれておりませんので、ご使用時に添加して下さい。

注 1)凍結細胞バイアルは到着後にドライアイスに入れたまま、−80℃冷凍庫の近くまで持って行き、素早く冷凍庫に入れてください。室温に晒す時間は 2-3 秒以内と最小限にしてください。

別途ご準備いただく試薬

- Fetal Bovine Serum [FBS; Life Technologies Co. (Gibco), Cat. 10437-028]
- Penicillin Streptomycin [Life Technologies Co. (Gibco), Cat. 15140]

1. 培地の調製

1.1. ReproCardio culture medium 2 (FBS-)を冷蔵庫 4℃に移して、一晩解凍して下さい。

1.2. 20 mL の FBS および 1 mL の Penicillin-Streptomycin を 80 mL の ReproCardio culture medium 2(FBS-)のボトルに入れて下さい。

1.3. 調製済みの培地類は 4℃で保管し、2 週間以内にご使用ください。再凍結は行わないでください。

2. 細胞の解凍

注 2)初めての場合は練習用バイアルを用いて解凍操作(ステップ 2.1-2.8)の練習を行なってください。この場合は遠心チューブ A のみご準備ください。チューブ B と C は不要です。

2.1. 調製後の培地を 10 mL ずつ 3 本の 15 mL 遠心チューブ (A, B, および C) に分注して、恒温槽(37℃)で 15 分以上温めて下さい。

2.2. 温められたチューブ A を安全キャビネットに運んで、すぐに操作ができるようにキャップを緩めて準備しておきます。

2.3. ドライアイスペレットを入れたアイスボックスを準備します。

2.4. 凍結細胞バイアル 1 本(以下、バイアル)を-80℃冷凍庫から取り出し、直ちにドライアイスペレットの内部に埋め込み、ウォーターバスの近くまで持ってきます。

2.5. バイアルをドライアイスペレットから取り出し、直ちにウォーターバスに入れます。バイアルを円を描くように揺すりながら **90 秒間**加温し、その後、ウォーターバスから取り出し、急いで安全キャビネットに移します。

注 4)ウォーターバスで加温する時間は90秒を厳守してください。時間超過により細胞が完全に解凍してしまうと細胞の生存率が著しく悪化しますのでご注意ください。

2.6. バイアルを安全キャビネット内に移動させ、付着した水滴をふき取った後に、バイアル内の細胞全量を、デカンタでチューブ A に素早く移します。

注 5)解凍開始からここまでを、必ず 2 分以内に行なってください(ウォーターバス 90 秒+移し替え 30 秒以内)。

2.7. さらに、バイアルに付着した細胞を回収するために、チューブ A

の培地 1 mL を空のバイアルに加えて、バイアルを洗い、チューブ A に戻します。

2.8. 室温、350 ×g 、5 分で遠心して下さい（設定できない場合は 300 ×g ）。

2.9. 遠心している間にチューブ B をウォーターバスから安全キャビネットに移します。

2.10. 遠心後のチューブ A を、細胞ペレットが再懸濁しないように慎重に安全キャビネットまで運んで下さい。

2.11. 細胞ペレットを吸わないように注意しながら上清を吸って下さい。細胞ペレットは見えにくいので、アスピレーターの先端は細胞から離すようにしてください。

2.12. 遠心チューブ B 内の培地（10 mL）をチューブ A へ入れて下さい。この時、ピペッティングはしないで下さい。

2.13. 室温、350 ×g 、5 分で遠心して下さい。

2.14. 細胞ペレットを吸わないように注意しながら 9 mL の上清を吸って1mL 残します。

2.15. P-1000 ピペットを 1 mL に設定して、6 回ピペッティングすることにより、細胞を懸濁させます。ピペッティングが強かったり、泡を立てると細胞に対してダメージとなりますので、ピペッティングは4秒数えながらゆっくり泡を立てないように行なって下さい。この時の細胞は 3.2×10 5 cells (1 mL) となります。

3. 細胞播種

細胞の播種に関しては、以下の取扱説明書をご覧ください。

- 薄層心筋の細胞外電位測定
- カルシウムイメージング
- パッチクランプ用の培養方法

3.1. 解凍から播種までの作業を必ず45分以内に行なってください。

よくある質問

Q1.FBS のメーカーについては指定がありますか？

A1.特にございません。

Q2.解凍時間が 90 秒より短いとどうなりますか？

A2. バイアルの内容物が十分に溶解していないため、チューブ A に移すことが困難となります。

Q3. 逆に解凍時間が 90 秒より長いとどうなりますか？

A3. 生存率、再形成率および生着率が低下し、その後、細胞が生育しません。

Q4. 解凍した細胞を 1 回目の遠心操作まで 5 分以内で行うにはどうすればいいですか？

A4. 練習用バイアルを使って練習をお願いします。また、操作 2.1.から 2.9.までの準備が整っていることを確認した後にバイアルの解凍を行ってください。もし可能であればできる限り恒温槽から近い位置での解凍播種操作を心がけてください。

Q5. 解凍した細胞がシングルに分散しているか、どうやって確認すればいいですか？

A5. 目視で凝集体が浮遊していなければ結構です。

Q6. シングルセルに分散する場合にピペッティングを繰り返して行ってよいですか？

A6. マイクロピペット（p-1000）で 10 回のピペッティングを限度としてください。

4. 製品の使用について

本品は研究用ですので、治療・診断目的には使用しないで下さい。また本品を当社からの許可なしに、第三者への販売や商業目的に使用することを禁じます。

株式会社リプロセル
Website: http://www.reprocell.com
E-mail: info_jp@reprocell.com